

OLIGONUCLEOTIDE DERIVATIVE AND ITS PREPARATION

Publication number: JP59093099

Publication date: 1984-05-29

Inventor: MIYOSHI KENICHI; FUWA TOORU

Applicant: WAKUNAGA SEIYAKU KK

Classification:

- International: C07H21/04; C07H21/02; C07H21/00; (IPC1-7):
C07H21/02; C07H21/04

- european:

Application number: JP19830204305 19831031

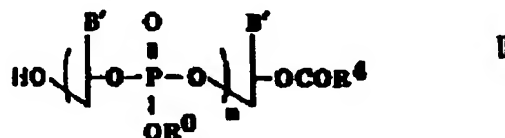
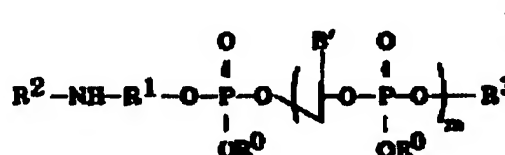
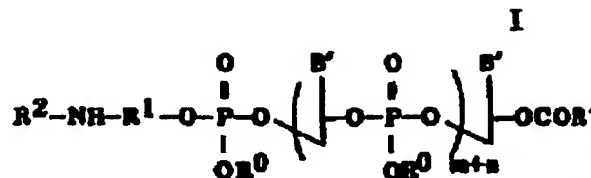
Priority number(s): JP19830204305 19831031

Report a data error here

Abstract of JP59093099

NEW MATERIAL:The compound of formula I (m and n are 0 or natural number; R<0> is protecting group of phosphate group; R<1> is bivalent hydrocarbon residue; R<2> is amino-protecting group; COR<4> is protecting group of 3'-terminal hydroxyl group of nucleotide; B' is base constituting nucleotide, etc.).

USE:Intermediate for preparation of resin for affinity chromatography, a non-radioactive affinity probe, etc. **PROCESS:**The compound of formula I can be prepared e.g. by reacting the compound of formula II (R<3> is protecting group of the 3'-terminal hydroxyl group of nucleotide) with the compound of formula III in the presence of a condensation agent (e.g. tosyl chloride), thereby forming a phosphate bond by the dehydrative condensation of the 3'-terminal phosphate group of the compound of formula II with the 5'-terminal hydroxyl group of the compound of formula III.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

⑨ 日本国特許庁 (JP)
⑫ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開
昭59—93099

⑤ Int. Cl.³
C 07 H 21/02
21/04

識別記号

庁内整理番号
7252—4C
7252—4C

⑬ 公開 昭和59年(1984)5月29日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 10 頁)

⑭ オリゴヌクレオチド誘導体およびその製造法

① 特 願 昭58—204305
② 出 願 昭57(1982)8月9日
③ 特 願 昭57—138136の分割
⑦ 発 明 者 三好健一
広島県高田郡吉田町吉田1366—

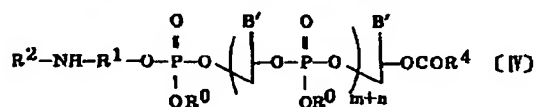
1
⑧ 発 明 者 不破亨
広島市中区小町6—17—602
⑨ 出 願 人 湧永製薬株式会社
大阪市福島区福島三丁目1番39号
⑩ 代 理 人 弁理士 猪股清 外2名

明 細 書

1. 発明の名称 オリゴヌクレオチド誘導体およびその製造法

2. 特許請求の範囲

1. 下式〔Ⅳ〕で示されるものであることを特徴とする、オリゴヌクレオチド誘導体。



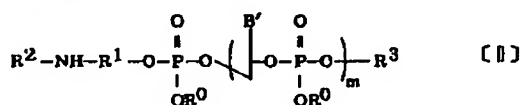
〔ただし、 m および n はそれぞれ0または任意の自然数であり、 R^0 はリン酸基の保護基であり、 R^1 は2価の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基であり、 R^2 はアミノ基の保護基であり、 COR^4 はヌクレオチドの3'-末端水酸基の保護基であり、 B' はヌクレオチドを構成する塩基であつて必要に応じて保護されたものである(B' が複数個存在するときはそれらは同一でも異なつてもよい)。〕

2. 塩基 B' がそれぞれ保護されたアデニン、シトシンおよびグアニンならびにチミン(保護不要)からなる群より選ばれたものである、特許請求の範囲第1項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。
3. R^0 がオルトクロロフェニル基またはパラクロロフェニル基である、特許請求の範囲第1項記載のオリゴヌクレオチド誘導体。
4. R^1 が炭素数2~20の直鎖または分岐鎖のアルキレン基である、特許請求の範囲第1~3項のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。
5. R^2 がオルトニトロフェニルスルフェニル基またはトリフルオロアセチル基である、特許請求の範囲第1~4項のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。
6. COR^4 基の R^4 が低級アルキル基またはアリール基である、特許請求の範囲第1~5項のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。
7. COR^4 基の R^4 がスパーサを介した担体であつて、ポリスチレン誘導体、シリカゲル誘導体ま

たはポリアクリルアミド誘導体である、特許請求の範囲第1～5項のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

8. m が0または6までの自然数、 n が0または10までの自然数である、特許請求の範囲第1～7項のいずれか1項に記載のオリゴヌクレオチド誘導体。

9. 下式〔II〕で示される化合物の R^3 を除去したものと、下式〔II′〕で示される化合物とを結合させて下式〔IV〕の化合物を得ることを特徴とする、下式〔IV〕で示されるオリゴヌクレオチド誘導体の製造法。



3. 発明の詳細な説明

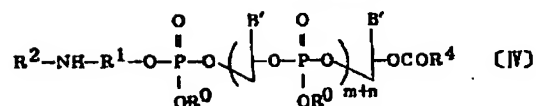
発明の背景

技術分野

本発明は、一般に、新規オリゴヌクレオチド誘導体に関する。さらに具体的には、本発明は、ヌクレオチドの塩基以外の部分にスペーサーを導入して保護されたアミノ基を導入してなるオリゴヌクレオチド誘導体に関する。本発明は、また、このようなヌクレオチド誘導体の製造法にも関する。

先行技術

近年、核酸の化学合成は新しい保護基の導入あるいはトリエステル法、ホスファイト法等の新しい縮合法の開発により飛躍的に発展している。また、遺伝子工学の急速な進歩とあいまって、核酸の化学合成がこの分野でも重要な意義をもつようになってきた。例えば、人工遺伝子を合成し、遺伝子置換え操作を利用して有用物質の生産が行なわれている（ヒト成長ホルモン：Nature, 281, 544 (1979)、白血球由来インターフェロン：Nature, 287, 411 (1980)。また、ハイブリ



〔ただし、 m および n はそれぞれ0または任意の自然数であり、 R^0 はリン酸基の保護基であり、 R^1 は2価の直鎖または分枝鎖の炭化水素残基であり、 R^2 はアミノ基の保護基であり、 R^3 はヌクレオチドの3'-末端リン酸基の保護基であり、 COR^4 はヌクレオチドの3'-末端水酸基の保護基であり、 B' はヌクレオチドを構成する塩基であつて、必要に応じて保護されたものである（ B' が複数個存在するときは、それらは同一でも異なつてもよい）。〕

10. 化合物〔II〕と〔II′〕との結合を縮合剤の作用下で行なう、特許請求の範囲第9項記載の方法。

11. 縮合剤がトシルクロリド、メシチレンスルホニルクロリド、メシチレンスルホニルテトラゾリドおよびメシチレンスルホニルニトロトリアゾリドのいずれかである、特許請求の範囲第10項記載の方法。

ド法のためのプローブ (Nucl. Acids Res., 9, 879 (1981))としてや、mRNAあるいは一本鎖DNAから逆転写酵素あるいはDNAポリメラーゼによつて二本鎖DNAを合成する際に必要な模型DNAに相補的なDNA断片（プライマー）として利用する例 (Nucl. Acids Res., 8, 4057 (1980))もある。さらには、核酸を結合させた担体を用いるアフイニティクロマトグラフィー用樹脂として、オリゴ(dT)-セルロースまたはポリ(U)-アガロースカラムを使つて3'-末端にポリ(A)を含むRNAを単離するという応用例 (J. Biochem., 81, 941 (1977))もある。

このように、核酸の有機化学的合成手段は、遺伝子工学、分子生物学等の分野の研究に多大な寄与をもたらすものである。

本発明者らは、現在まで、オリゴヌクレオチドの有機化学的合成分野で固相法を有力な合成手段として種々のオリゴヌクレオチドの合成を行なつてその応用を検討してきたが、特にアフイニティクロマトグラフィー用樹脂あるいは非放射性アフ

イニティプロープ等を開発すべく鋭意努力を重ねた結果、これらの製造の際に有用な中間となるオリゴヌクレオチドを見出した。

現在まで開発あるいは市販されているアフィニティクロマトグラフィー用樹脂 (Arch. Biochem. Biophys., 168, 561 (1974)、J. Biochem., 83, 783 (1978)、特開昭52-25795号、同53-101396号、同53-133283号および同55-36277号各公報) や非放射性アフィニティプロープ (Proc. Natl. Sci. USA, 78, 6633-6637 (1981)) に用いられているオリゴヌクレオチド誘導体の製造法は、一般に合成にわたりめんどりであるという共通の難点をかかえていて応用範囲が限定されているのが現状である。

発明の概要

要旨

本発明は上記の点に解決を与えることを目的とし、特定のオリゴデオキシリボヌクレオチドのヌクレオチドの塩基以外の特定部位にアミノ基を導入してなるオリゴヌクレオチド誘導体によつてこ

〔ただし、 m および n はそれぞれ0または任意の自然数であり、 R^0 はリン酸基の保護基であり、 R^1 は2価の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基であり、 R^2 はアミノ基の保護基であり、 R^3 はヌクレオチドの3'-末端リン酸基の保護基であり、 B' はヌクレオチドを構成する塩基であつて、必要に応じて保護されたものである (B' が複数個存在するときは、それらは同一でも異なつてもよい)。〕

効果

本発明者らの合成したオリゴデオキシリボヌクレオチドは、その合成の際の難点を回避し得るのであつて、以下のような長所をもつ。

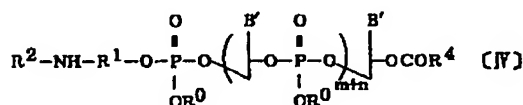
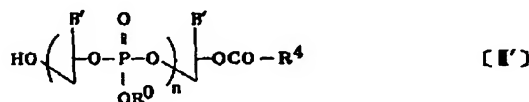
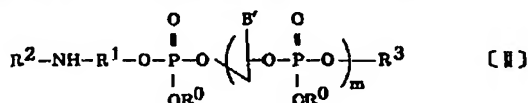
(a) オリゴヌクレオチド中に存在する他の官能基 (水酸基、リン酸基、塩基部分のアミノ基等) よりも反応性が高いアミノ基を5'-末端に接合しに有するので、この部分で選択的に他の化合物の官能基 (たとえば、 $-COOH$ 、カルボン酸活性エステル、ブロムシアンで活性化したOH基、その他) と結合させることができる。

(b) 上記アフィニティクロマトグラフィー用樹脂

の目的を達成しようというものである。

従つて、本発明によるオリゴヌクレオチド誘導体は、下式〔IV〕で示されるものであること、を特徴とするものである。

また、本発明による下式〔IV〕で示されるオリゴヌクレオチド誘導体の製造法は、下式〔II〕で示される化合物の R^3 を除去したものと、下式〔II'〕で示される化合物とを結合させて下式〔IV〕の化合物を得ること、を特徴とするものである。



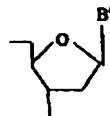
や非放射性アフィニティプロープ等合成の際有用な中間体となる。

(c) 合成が容易で大規模合成が可能である (特に本発明者らが確立した固相合成法を併用すればその効果はさらに大きい)。

発明の具体的説明

オリゴヌクレオチド誘導体〔IV〕

本発明によるオリゴヌクレオチド誘導体は、前記の式〔IV〕で示されるものである。式中 B' は、2'-デオキシリボヌクレオシドの3'-および5'-水酸基を除いたデオキシリボヌクレオシド残基を示すのに慣用されているものであつて、具体的に下記構造のものである。



置換基 B' は、ヌクレオチドを構成する塩基であつて必要に応じて保護したもの、を示す。本発明で「必要に応じて保護された」というときの「必

要に応じて」ということは、当該デオキシリボヌクレオチド誘導体を合成しあるいはこれを他の反応に供する場合にこの塩基をこれらの反応の際に他の試薬からの攻撃から保護する必要がある場合には、ということの意味する。どのような場合にそのような保護が必要であるかあるいはどのような保護基が使用されるかに関しては、核酸合成に関する文献または成書たとえば後記したものを参照することができる。B'の具体例は、通常はそれぞれアシル化したアデニン、シトシンまたはグアニンあるいはチミン（保護不要）から選ばれたものである。化合物[IV]中にB'が複数個存在するときは、それらは同一でも異なつてもよい。

mおよびnはそれぞれ0または自然数を示す。本発明のオリゴヌクレオチド誘導体の重合度がm+nで表わされているのは、本発明の好ましい製造法で重合度がそれぞれmまたはnのフラクションを重合させていることによるものである（詳細後記）。その場合、mは実用的には0~6、特に1~4、nは実用的には0~40、特に0~20、で

る、またはメチル置換フェニル）または固相合成法の採用いられる適当なスパーサーをもつ担体（ポリスチレン誘導体a）、シリカゲル誘導体、ポリグリッド誘導体b等）がある。

a) Chem. Rev. 77, 183 (1977)

Forsch. Chem. Org. Naturstoffe, 32, 297 (1975)

b) J. Am. Chem. Soc. 98, 8514 (1976)

Nucl. Acids Res. 4, 1135 (1977)

, , , 4, 4391 (1977)

, , , 6, 1265 (1979)

, , , 8, 5491 (1980)

Tetrahedron Letters, 1977, 1819

, , 1979, 3635

化合物[IV]の合成

一般的説明

化合物[IV]、すなわち本発明によるオリゴヌクレオチド誘導体は、合目的な任意の方法によって合成することができる。

一つの好ましい方法は、前記の式[II]で示され

ある。

基R⁰は、リン酸基を保護する置換基である。これは、通常は置換されたフェニル基であつて、複数個のR⁰は同一でなくてもよい。オルトまたはパラクロロフェニル基が好ましい。

基R¹は、化合物[IV]の核酸部分とアミノ基部分とを連結する二価の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基、特に炭素数2~20程度のアルキレン基、である。

基R²は、5'-末端延長上のアミノ基の保護基である。アミノ基の保護基は種々あるが、本発明においては、化合物[IV]の製造工程および、さらにその応用から考えれば、各保護基の除去の際安定でありかつヌクレオチドの部分の安定なままで除去できるものが好ましい。以上の観点からすれば、R²としてはオルトニトロフェニルスルフェニル基(NPS)またはトリフルオロアセチル基(TFA)等があり、なかでもトリフルオロアセチル基が好ましい。

基COR⁴は通常のオリゴヌクレオチド合成の際に用いられる3'-末端水酸基の保護基である。基R⁴は低級アルキル基、アリール基（特にフェニ

ル化合物のR³を除去したものと、式[II']で示される化合物とを結合させることからなるものである。

一方、化合物[II]、[II']も合目的な任意の方法、すなわち通常の核酸合成法で合成することができる。本発明者らの固相合成法に従うのが好ましい（詳細後記）。

第1図は、この好ましい合成法の一例を示すフローチャートである。フローチャート中の記号は下記の意味をもつ（その意味ないし詳細は、前記および後記した通りである。）

R⁰ リン酸基を保護する置換基であつて、通常オルトクロロフェニル基が用いられる。

R¹ 二価の直鎖または分岐鎖の炭化水素残基である。

R² アミノ基の保護基であつて、通常トリフルオロアセチル基が用いられる。

R³ 他のすべての保護基が安定な条件下で容易に脱離されて、リン酸ジエステルを与えることができる置換基であつて、通常シアノエチル基が用

いられる。

COR⁴ 通常のオリゴヌクレオチド合成に用いられる3'-末端水酸基の保護基である。

R⁵ 通常のオリゴヌクレオチド合成の際に用いられる5'-末端水酸基の保護基であつて、通常ジメトキシトリチル基である。

m 0または任意の自然数。

n 0または任意の自然数。

B' 保護された塩基を示すが、通常はN⁶-ベンゾイルアデニン、N'-イソブチルグアニン、N⁶-ベンゾイルシトシンおよびチミン(すなわち、保護不要)より選択される。

化合物[II]の合成

化合物[II]の合成は、オリゴヌクレオチドの合成および生成ヌクレオチドの5'-水酸基延長上で一級アミノ基の導入からなる方法で行なうことができる。その一実施態様は、化合物[0]の5'-水酸基をリン酸化し、次いで化合物[I]を結合させることからなる(第1図参照)。リン酸化方法としては2種のリン酸化試薬を用いるが、該試薬

Nucleic Acids Research 8, 5491(1980)

Nucleic Acids Research 8, 5507(1980)

Nucleic Acids Research Symposium Series 7, 281 (1980)

従つて、化合物[II]合成の一実施態様は、固相合成法に従つて化合物[II]を合成し、この化合物の5'-末端基(R⁵)を水酸化して得ることからなるものである(詳細は後記実験例参照のこと)。

基R⁵はオリゴヌクレオチドを合成する際に通常用いられる保護基であつて、直鎖または分岐鎖のトリチル基が用いられる。この場合、基R⁵の除去は、ベンゼンスルホン酸、酢酸または臭化亜鉛の1.0Mイソプロパノール-塩化メチレン溶液中で行なう等の方法がある。また、通常基R⁵としてはジメトキシトリチルを用いる。

なお、化合物[0]および[II]等のオリゴヌクレオチドの合成法は既に各種のものが公知であつて保護基の種類およびその導入ないし除去ならびに縮合その他について上記以外の詳細は、核酸の化学合成に関する成書や誌説、たとえば、「ヌクレ

として、ホスホトリアゾリド、ホスホジクロリドまたはホスホメンソトリアゾリド等がある。

とらて化合物[0]は、通常既知の核酸合成法に従つて合成できるが、本発明者らの確立した固相合成法に従うのが好ましい(後記文献参照)。

また、化合物[I]は、アミノアルキレンアルコール(NH₂-R¹-OH)のアミノ基をR²で保護することにより得ることができる。なお、アミノアルキレンアルコールはC₂~C₁₂のものが市販されてゐて、入手が容易である。

化合物[III]の合成

化合物[III]の合成は、既知のオリゴヌクレオチド合成法に従つても、本発明者らの固相合成法に従つて行なつてもよい。一般に、オリゴヌクレオチド合成法としては、トリエステル法、ホスファイト法およびそれぞれの固相法および液相法があるが、本発明者らの開発した固相合成法(下記文献参照)が好ましい。

Tetrahedron Letters 1979, 3635(1979)

Nucleic Acids Research 8, 5473(1980)

「ヌクレオチドの合成」(丸善1977年)、「核酸有機化学」(化学同人1979年)、「核酸」(朝倉書店1979年)、Tetrahedron, 34, 3143 (1978)、有機合成化学, 34, 723(1978)および化学の領域, 33, 566 (1979)等を参照することができる。

化合物[IV]の合成

オリゴヌクレオチド誘導体(化合物[IV])は、上記の化合物[II]と[III]とを結合させることにより得ることができる。

両者の縮合は、縮合剤の存在下において化合物[III]の5'-末端水酸基と化合物[II]の3'-末端リン酸基との脱水縮合によるリン酸結合を實現する方法によつて行なうことができる。

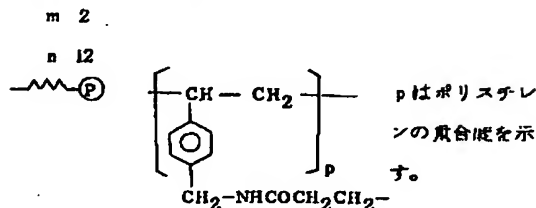
この場合の縮合剤としては、トシルクロリド、メシチレンスルホニルクロリド、メシチレンスルホニルテトラゾリドおよびメシチレンスルホニルニトロトリアゾリド等があるが、メシチレンスルホニルニトロトリアゾリドが好ましい。詳細な反応条件等は後記実験例を参照されたい。

実 験 例
フローチャート

第2図のフローチャートに従つて、本発明の化合物(同図の化合物④)を製造した。

第2図で、記号は次の意味を持つ。

B' ベンゾイル化アデニン
DMTr ジメトキシトリチル
CE シアノエチル
TFA トリフルオロアセチル



化合物[IV] (第2図の④) の合成

実験例1

6-アミノヘキサノール 1.17g (10mmol) をジオキサン (15ml) に溶解し、トリフルオロアセチルシオエチル 1.80ml (14.4mmol) を加え、室温

で反応を行なう。反応終了後、この溶液を濃縮し、残渣をエーテルに溶解し、水で3回抽出を行なう。エーテル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、濃縮を行なう。残渣にエーテルを加えて溶解した後、ペンタンを加えて結晶化させることにより、粉末状の化合物 [(1)] (トリフルオロアセチル-6-アミノヘキサノール) を得る。

次に、既知の方法で合成した 5'-ヒドロキシ-ジヌクレオチド [(6)] 800mg (0.71mmol) をピリジン共沸により無水にし、これにオルトクロロフェニルホスホロジトリブチリド (1.0mmol) のジオキサン (6.0ml) 溶液を加えて2時間反応させ、続いて化合物 [(1)] 300mg (1.4mmol) および1-メチル-イミダゾール 115mg (1.4mmol) を加えてさらに2時間反応させる。反応の終了を確認後、ピリジン-水を加えて過剰のトリブチリドを分解し、溶媒を留去する。残渣をクロロホルムに溶解した後、水、0.5Mリン酸二水素ナトリウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウムおよび5%塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥する。クロロホルム層を濃縮後、シリカゲルカラムで精製 (溶出液として0~4%のメタノール含有クロロホルムを使用) し、目的物を含む溶出液を濃縮後、この溶液をペンタン中に滴下して、粉末状の化合物 [(2)] を得る。

一方、ジメトキシトリチルアデノシン/樹脂 [(4)] (ここで樹脂は担体に過ぎないが、樹脂に担持された目的化合物は外観的には樹脂そのものと変わらないので樹脂に担持された当該化合物を以下において単に樹脂と呼ぶことにする) 300mg (0.33mmol) をイソプロパノール-塩化メチレン (15:85) (v/v) 溶液 10ml で3回洗浄後、臭化亜鉛の 1.0M のイソプロパノール-塩化メチレン溶液 8ml で5分間ずつ4回反応させて樹脂 [(4)] の脱トリチル化合物 [(6)] を得る。

樹脂 [(6)] をイソプロパノール-塩化メチレン溶液 10ml で3回洗浄し、これにジヌクレオチド [(6)] 150mg (0.1mmol) のピリジン溶液を添加後、共沸させてこの溶液系を無水とし、メシチレンスルホニルニトロトリブチリド 150mg (0.5mmol) と

で一夜反応を行なう。反応終了後、この溶液を濃縮し、残渣をエーテルに溶解し、水で3回抽出を行なう。エーテル層を無水硫酸ナトリウムで乾燥後、濃縮を行なう。残渣にエーテルを加えて溶解した後、ペンタンを加えて結晶化させることにより、粉末状の化合物 [(1)] (トリフルオロアセチル-6-アミノヘキサノール) を得る。

次に、既知の方法で合成した 5'-ヒドロキシ-ジヌクレオチド [(6)] 800mg (0.71mmol) をピリジン共沸により無水にし、これにオルトクロロフェニルホスホロジトリブチリド (1.0mmol) のジオキサン (6.0ml) 溶液を加えて2時間反応させ、続いて化合物 [(1)] 300mg (1.4mmol) および1-メチル-イミダゾール 115mg (1.4mmol) を加えてさらに2時間反応させる。反応の終了を確認後、ピリジン-水を加えて過剰のトリブチリドを分解し、溶媒を留去する。残渣をクロロホルムに溶解した後、水、0.5Mリン酸二水素ナトリウム水溶液、飽和炭酸水素ナトリウムおよび5%塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥

無水ピリジン 2ml とを添加して90分間反応 (縮合) させる。反応後、ピリジン 10ml で3回洗浄し、触媒量 (約 10mg) のジメチルアミノピリジンを含む無水酢酸-ピリジン (1:9) (v/v) 溶液 10ml を添加し10分間反応させて未反応 5'-水酸基をアセチル化して保護し、これをピリジンで洗浄して化合物 [(3)] を得る。このような縮合反応操作を6回くり返して、化合物 [(3)] n=12 を得る。

次に、化合物 [(3)] n=12 115mg (3.45μmol) を樹脂 [(6)] と同様の方法で脱トリチル化した化合物 [(3)'] に、化合物 [(2)] 60mg (0.04mmol) をトリエチルアミン-ピリジン-水 (1:3:1, (v/v)) 溶液 3ml で処理 (脱シアノエチル化) した化合物 [(2)'] を加え、無水にしたのち、メシチレンスルホニルニトロトリブチリド 50mg (0.2mmol) およびピリジン 1ml を加えて90分間反応 (縮合) させ、反応終了後、樹脂をピリジンおよびメタノールで洗浄し、乾燥して、完全に保護されたオリゴヌクレオチド誘導体 [(4)] を得る。

なお、化合物 [(4)] の確認を高速液体クロマトグ

ラフィーで行なつた。そのために保護基の除去を以下の条件で行なつた。すなわち、化合物〔4〕15 mg を0.5 Mテトラメチルグアニジン・ピリジン-2-カルボアルドキシメイトのジオキサン-水(9:1 (v/v))溶液200 μ lを加え、凍沈管中、室温で24時間反応させる。反応後、濃アンモニア水(2.5 ml)を加えて密閉し、50℃で一夜反応させる。反応終了後、戸越し、戸液を濃縮後、水に溶解してからエーテルで抽出を行なう。水層を濃縮後セフアデックスG-50(ϕ 1.5 \times 120cm、溶出液は0.05 Mの炭酸トリエチルアンモニウム緩衝液pH 7.5)で脱塩精製して、化合物〔4〕からすべて保護基を除去した。このときの化合物のセフアデックスの溶出パターンおよび、高速液体クロマトグラフィー(μ -Bondapak C18)で純度を検定した際の溶出パターンを、それぞれ第3図および第4図に示した。

同様の方法で式〔IV〕で示される化合物を合成し、その化合物の確率も同様の方法で行なつた。なお、実験例2および4についてのセフアデックスと高

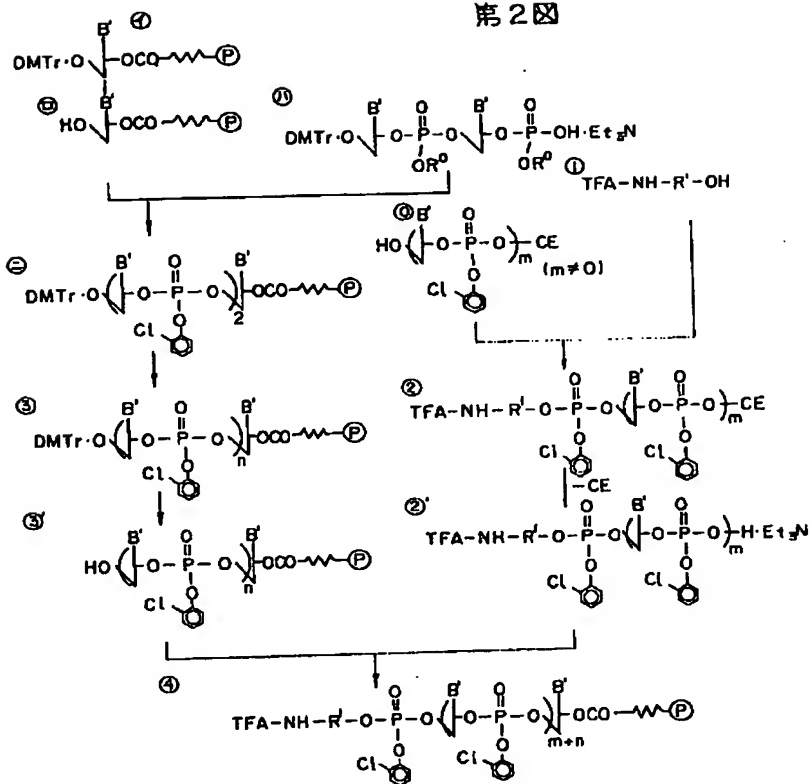
速液体クロマトグラフィーの結果を、それぞれ第5～6図および第7～8図に示した。これらの結果から、化合物の合成が確認された。

また、上記実験例1～7の製造の際のB', m, n, R¹, R²および塩基配列を第1表に示した。第1表中、「化合物」とは、第2図中の化合物を示す。

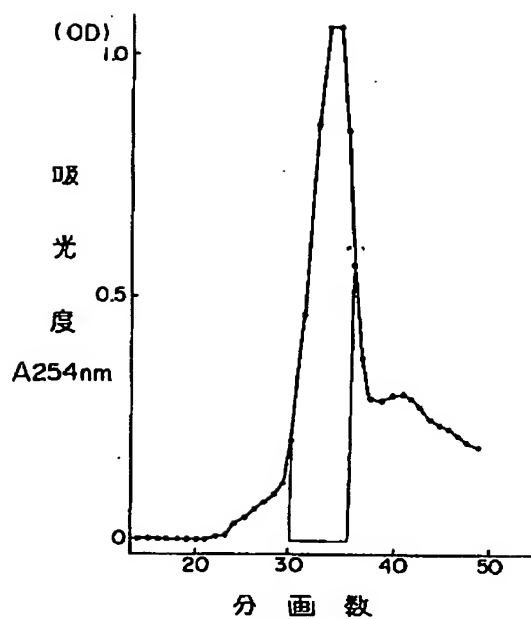
第 1 表

| 化合物 実験例 | ① | | R ¹ *1 | R ² *1 | ② | ③ | | ④ | |
|------------|---|---|--------------------------------|-------------------|------------------|----|--------------------------------|-----|--------------------------------|
| | B' | m | | | 塩基配列 | n | 塩基配列 (B') ⁿ B' | m+n | 塩基配列 (B') ^{m+n} B' |
| 1 | A ^{*2} | 2 | C ₆ H ₁₂ | TFA | AA ^{*2} | 12 | AAAAAAAAAAAAAAAA ^{*2} | 14 | AAAAAAAAAAAAAAAA ^{*2} |
| 2 | T | 2 | | | TT | 12 | TTTTTTTTTTTTTT | 14 | TTTTTTTTTTTTTTTT |
| 3 | A | 2 | | | AA | 9 | AAAAAAAAAA | 11 | AAAAAAAAAAAA |
| 4 | T | 1 | | | TT | 11 | GGGAAGCTTCCC | 13 | TTGGAAGCTTCCC |
| 5 | T | 2 | | | TT | 12 | TTTTTTTTTTTTTT | 14 | TTTTTTTTTTTTTTTT |
| 6 | G | 2 | | | GG | 14 | GAAGCTTTCACGTAA | 16 | GGGAAGCTTTCACGTAA |
| 7 | G | 2 | | | GG | 14 | GTCGACTAACGCAGT | 16 | GTCGACTAACGCAGT |
| 備 考 | <p>*1 化合物④を合成する際には用いなかつたが、他にも(R¹, R²)の組み合わせが下記である化合物①をも合成した。〔 〕は収率を示す。 (-C₂H₄-NPS)〔79%〕 (-C₆H₁₂-NPS)〔72%〕 (-C₆H₁₀-TFA)〔56%〕</p> <p>*2 塩基配列は、A、G、Cと示してあるが、実際はアシル化して保護したものであつて略記してある。すなわち A = A^{Bz} = N⁶-ベンゾイルアデニン C = C^{Bz} = N⁶-ベンゾイルシトシン G = G^{1Bu} = N-イソブチルグアニン なおT(チミン)は保護不要である</p> | | | | | | | | |

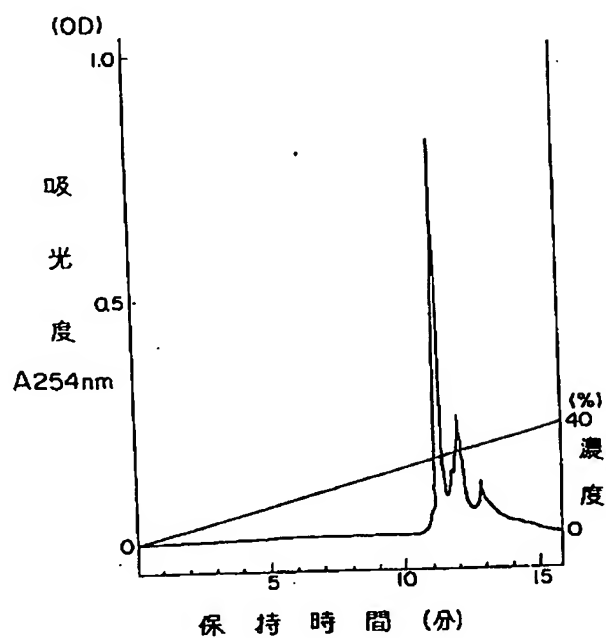
第2図



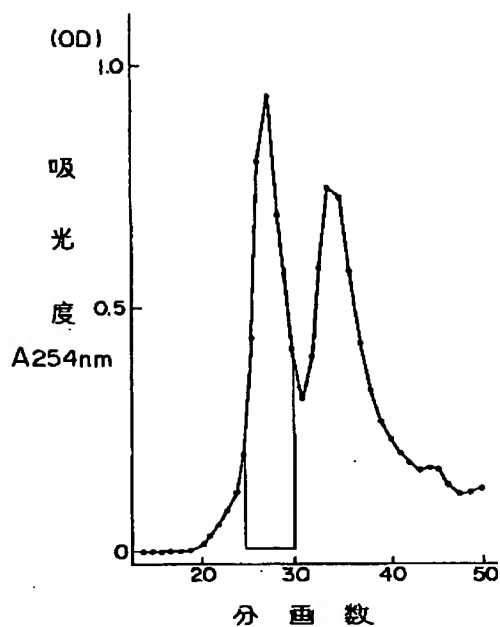
第3図



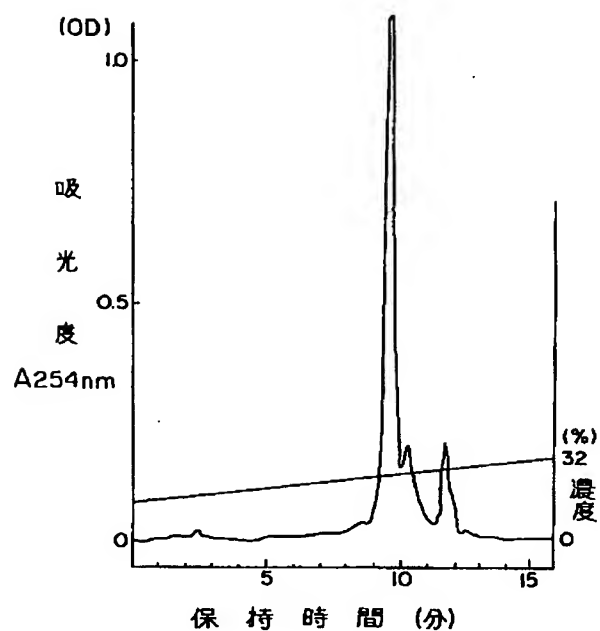
第4図



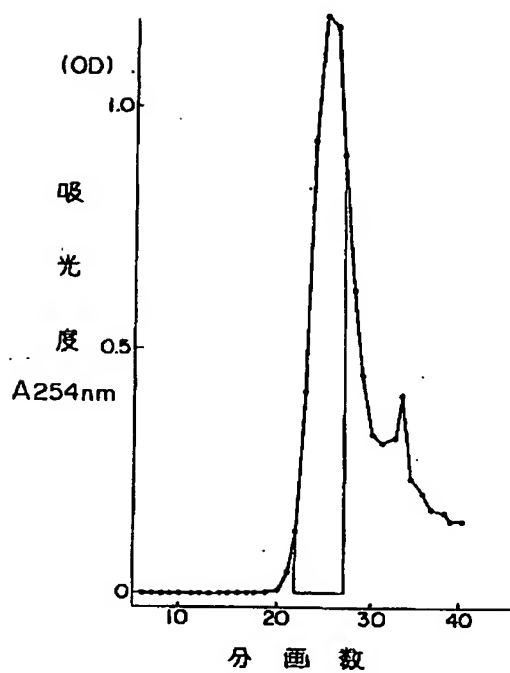
第5図



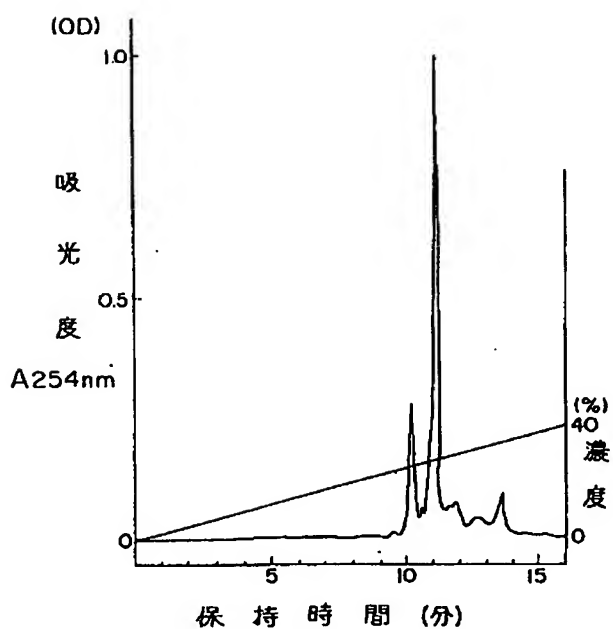
第6図



第7図



第8図



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.